

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 octobre 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/083892 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 15/01

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/01252

(22) Date de dépôt international : 10 avril 2002 (10.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

01/04856

10 avril 2001 (10.04.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur
Roux, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR];
3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAR-
LIERE, Philippe [FR/FR]; 2, allée Saint Martin, F-91450
Etiolle (FR). POCHET, Sylvie [FR/FR]; 5, rue Gossec,
F-75724 Paris 12 (FR). BOUZON, Madeleine [FR/FR];
4, rue des Capucins, F-92190 Meudon (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: MUTANTS OF DESOXYCYTIDINE KINASE HAVING EXTENDED ENZYMATIC ACTIVITY

(54) Titre : MUTANTS DE LA DESOXYCYTIDINE KINASE POSSEDANT UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ELARGIE

(57) Abstract: The invention relates to a method for artificial *in vivo* evolution of proteins, said method making it possible to bring about the evolution of a protein X by complementation of a relative protein Y, X and Y both belonging to the same class of enzyme commission (EC) nomenclature or belonging to related classes. The mutants D133E and R104Q of desoxycytidine kinase (DCK) were obtained; both of said mutations result in acquisition of thymidine kinase activity by DCK.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé d'évolution artificielle *in vivo* de protéines, ledit procédé permettant de faire évoluer une protéine X par complémentation d'une protéine apparentée Y, X et Y appartenant tous deux à la même classe de la nomenclature enzymatique EC ou à des classes voisines. Les mutants D133E et R104Q de la desoxycytidine kinase (DCK) ont été obtenus, chacune de ces mutations conférant l'acquisition de l'activité thymidine kinase par DCK.

WO 02/083892 A2

MUTANTS DE LA DESOXYCYTIDINE KINASE POSSEDANT UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ELARGIE

5 La présente invention se rapporte à un procédé d'évolution artificielle *in vivo* de protéines, ledit procédé permettant de faire évoluer une protéine X par complémentation d'une protéine apparentée Y, X et Y appartenant tous deux à la même classe de la nomenclature enzymatique EC ou à des classes voisines. Les mutants D133E et R104Q de la désoxycytidine kinase (DCK) ont été obtenus,
10 chacune de ces mutations conférant l'acquisition de l'activité thymidine kinase par DCK.

Les techniques de séquençage et d'amplification PCR font appel à une gamme de plus en plus diversifiée de nucléosides triphosphates, les monomères activés qui
15 peuvent être condensés par les ADN polymérases. De tels monomères artificiels se distinguent des quatre monomères naturels tant par des altérations chimiques de la base hétérocyclique [Sala et al, 1996] que du sucre pentose et du groupement triphosphate. La préparation des dérivés triphosphate s'effectue généralement à partir des nucléosides correspondants en soumettant l'alcool 5' libre à une phosphorylation
20 puis en condensant le 5' phosphate au pyrophosphate, pour donner le triphosphate. La catalyse de l'étape de phosphorylation par une nucléoside kinase consommant de l'ATP constitue un procédé valide à l'échelle industrielle. Un tel procédé de synthèse n'est envisageable qu'avec des enzymes présentant une activité élargie, c'est à dire des nucléosides kinases capables de phosphoryler n'importe quel nucléoside avec
25 une efficacité similaire. D'une manière plus générale, l'obtention d'enzymes présentant des activités élargies permettrait d'avoir accès à des outils puissants pour toute sorte d'applications biotechnologiques.

Diverses solutions pour effectuer des mutations dirigées dans une molécule d'ADN
30 ont été décrites dans l'état de la technique. Ces techniques consistent à introduire *in vitro* une mutation, une délétion ou une insertion en un site déterminé dans une

molécule d'ADN par exemple en utilisant la PCR. Ces diverses techniques sont décrites dans Hall, et al. Protein Eng. 4:601 (1991); Hemsley, et al. Nucleic Acids Research 17:6545-6551 (1989); Ho, et al. Gene 77:51-59 (1989); Hultman, et al. Nucleic Acids Research 18:5107-5112 (1990); Jones, et al. Nature 344:793-794 (1990); Jones, et al. Biotechniques 12:528-533 (1992); Landt, et al. Gene 96:125-128 (1990); Nassal, et al. Nucleic Acids Research 18:3077-3078 (1990); Nelson, et al. Analytical Biochemistry 180:147-151 (1989); Vallette, et al. Nucleic Acids Research 17:723-733 (1989); Watkins, et al. Biotechniques 15:700-704 (1993); Weiner, et al. Gene 126:35-41 (1993). Yao, et al. PCR Methods and Applications 1:205-207 (1992) et dans Weiner et al, Gene 151:1/9-123(1994).

Outre les problèmes techniques rencontrés, il est impossible de savoir à l'avance quelle serait l'effet d'une mutation donnée sur l'activité d'une protéine avec de telles techniques.

D'autres méthodes consistent à introduire des mutations au hasard dans le génome par l'emploi d'agents mutagènes (2-aminopurine, hydroxylamine ou ACRIDINE) et à sélectionner les cellules ou organismes montrant le phénotype recherché. Néanmoins, ces méthodes conduisent à l'introduction de nombreuses mutations, parfois létales, et ne sont pas adaptées à faire évoluer une protéine donnée dans un but précis.

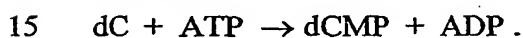
L'art antérieur montre également que l'on peut employer des systèmes *in vivo*, par exemple en utilisant des ADN polymérase exo-, ou d'autres protéines pouvant introduire des mutations (US 6,015,705), mais aucune de ces techniques ne s'apparente à la méthode proposée par la présente invention.

Pour répondre aux besoins et problèmes évoqués précédemment, la présente invention propose un procédé d'évolution artificielle *in vivo* de protéines. Ce procédé permet de faire évoluer *in vivo* une protéine X par complémentarité d'une protéine apparentée Y, X et Y appartenant tous deux à la même classe de la nomenclature enzymatique EC ou à des classes voisines. En effet, on a démontré qu'il est possible de modifier par mutation l'activité d'un enzyme d'une classe, non seulement à

l'intérieur d'une même classe, mais également de lui faire acquérir les activités caractérisant les classes voisines (3 premiers chiffres de la nomenclature EC en commun). En d'autres termes, l'invention apporte un procédé pour faire évoluer une protéine X pour qu'elle acquière l'activité d'une autre protéine Y, X conservant au moins une de ses propriétés ou activités initiales et donc présentant *in fine* une activité élargie.

Ce procédé est particulièrement adapté à des enzymes du type nucléotidyl kinase, phosphorylase et nucléotidyl transférases, car on peut mettre à profit leur capacité à introduire des mutations dans leur propre gène.

A ce titre, l'invention a été mise en œuvre pour la désoxycytidine kinase d'Homo sapiens (DCK) qui est un enzyme capable de phosphoryler une large gamme de nucléosides présentant une parenté chimique avec la désoxycytidine (dC), suivant la réaction :



En plus de la désoxycytidine, cet enzyme reconnaît comme substrats les désoxynucléosides puriques dA et dG ainsi que des analogues structuraux de bases ou de sucres, comme la 5-aza-cytidine (5azadC) et l'arabinocytidine. Toutefois, la thymidine n'est pas substrat de l'enzyme *in vitro* [Datta et al, 1989]. L'ADNc spécifiant la désoxycytidine kinase humaine a été cloné et séquencé [Chottiner et al, 1991, numéro d'accès dans GENBANK : M60527], révélant des similarités entre DCK et les thymidine kinases des virus herpétiques [Harrison et al, 1991]. De même, la structure tridimensionnelle de la thymidine kinase de l'herpès a été résolue par radiocristallographie [Brown et al, 1995]. Le brevet américain US 6,063,376 décrit une seconde désoxycytidine kinase humaine appelée DCK2 qui possède 60 % d'identité avec DCK1.

Dans le procédé selon l'invention, on a mis à profit la propriété de mutateur conditionnel de DCK en présence d'analogues de nucléosides promutagènes pour soumettre son propre gène *dck* à un épisode de mutagenèse *in vivo*.

Ainsi, des bactéries de génotype *Δdeo tdk p::dckH+* furent exposées soit à la 2-amino-2'-désoxyribosyl-purine (disoA) soit à la 2-amino-désoxyribosyl-2-hydroxy-purine (disoG), puis incubées sur milieu solide riche en présence de triméthoprimine et de thymidine. Des colonies sont apparues suite à l'administration des deux composés
5 à une fréquence de l'ordre de 10^{-8} . Aucune colonie ne survint en absence de nucléoside promutagène.

Le séquençage des gènes de 7 plasmides mutants obtenus indépendamment (4 après mutagenèse par disoG, 3 par disoA) a mis en évidence deux mutations ponctuelles
10 D133E et R104Q, chacune conférant l'acquisition de l'activité thymidine kinase par DCK. En outre, un plasmide réunissant les deux mutations dans un même allèle a été construit et introduit dans la souche *β7117* de génotype *Δdeo tdk*. Il a permis la complémentation de la *tdk* inactivée par mutation ou délétion, exprimant donc aussi une activité thymidine kinase.

15

Description

Ainsi, de manière générale, la présente invention se rapporte à un procédé d'évolution *in vivo* artificielle de protéines, ledit procédé permettant de faire évoluer
20 *in vivo* une protéine X par complémentation d'une protéine apparentée Y, X et Y appartenant tous deux à la même classe de la nomenclature enzymatique EC ou à des classes voisines.

Un tel procédé permet de faire évoluer une protéine X de sorte à en modifier ses
25 caractéristiques et comprend les étapes suivantes :

- a) obtention de cellules comportant un génotype [protéine Y* : :protéine X+], par transformation de cellules [protéine Y*] avec un acide nucléique comprenant le gène codant pour la protéine X, Y* signifiant que le gène codant pour Y a été inactivé, Y étant une protéine appartenant à une classe voisine de X possédant
30 une activité voisine, les classes de X et Y se caractérisant en ce qu'elles

possèdent au moins les trois premiers chiffres appartenant aux classes EC de la nomenclature internationale à 4 chiffres, lesdites cellules présentant un phénotype auxotrophe nécessitant pour survivre l'apport du produit de la réaction de Y sur son substrat dans le milieu de culture ;

- 5 b) exposer les cellules obtenues à l'étape a) à un mutagène,
c) mettre en culture lesdites cellules dans un milieu comprenant le substrat de Y, le produit de la réaction de Y sur son substrat étant nécessaire à la survie de ladite cellule,
d) sélectionner les cellules qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles la protéine X,
10 modifiée par l'action dudit agent mutagène, complémente la déficience en la protéine Y.

A l'étape b), toute technique visant à augmenter la sensibilité de la cellule vis-à-vis d'un mutagène ou d'un promutagène, par exemple par expression d'une kinase,
15 d'une phosphorylase ou d'une ADN pol exo-, peut être utilisée. De préférence, on utilise un vecteur d'expression de la DCK1 comportant les mutations D133E et R104Q décrite ci-après.

Dans le cadre de l'invention, le terme «Y*» signifie que le gène codant pour Y a été
20 inactivé, c'est à dire qu'il a été délété en tout ou en partie, ou inactivé par insertion d'une séquence ou par introduction d'une mutation. Il faut signaler que l'invention peut également être exécutée dans le cas de modification du gène Y conduisant à un phénotype du type Ts (température sensible). Dans ce cas, les cellules sont cultivées à des températures non permises pendant la phase de sélection (étapes c) et d)).

25

Parmi, les protéines que l'on cherche à faire évoluer, on peut citer notamment :

- les protéines appartenant à la famille des kinases, telles que par exemple

Numéro EC

Nom selon la nomenclature internationale

2.7.1.20

Adenosine kinase.

30 2.7.1.21

Thymidine kinase.

	2.7.1.38	Phosphorylase kinase.
	2.7.1.49	Hydroxymethylpyrimidine kinase.
	2.7.1.74	désoxycytidine kinase (DCK).
	2.7.4.6	Nucleoside-diphosphate kinase.
5	2.7.4.7	Phosphomethylpyrimidine kinase.
	2.7.4.8	Guanylate kinase.
	2.7.4.9	Thymidylate kinase.
	2.7.4.10	Nucleoside-triphosphate-adenylate kinase.
	2.7.4.11	(Deoxy)adenylate kinase.
10	2.7.4.12	T2-induced deoxynucleotide kinase.
	2.7.4.13	(Deoxy)nucleoside-phosphate kinase.

- les nucléotidyl transférase, telles que par exemple

	Numéro EC	Nom selon la nomenclature internationale
15	2.7.7.6	DNA-directed RNA polymerase.
	2.7.7.7	DNA-directed DNA polymerase.
	2.7.7.8	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase.
	2.7.7.19	Polynucleotide adenylyltransferase.
	2.7.7.25	tRNA adenylyltransferase.
20	2.7.7.48	RNA-directed RNA polymerase.
	2.7.7.49	RNA-directed DNA polymerase.
	2.7.7.50	mRNA guanylyltransferase.

- les phosphorylases, telles que par exemple

	Numéro EC	Nom selon la nomenclature internationale
25	2.4.2.1	Purine-nucleoside phosphorylase.
	2.4.2.2	Pyrimidine-nucleoside phosphorylase.
	2.4.2.3	Uridine phosphorylase.
	2.4.2.4	Thymidine phosphorylase.
30	2.4.2.7	Adenine phosphoribosyltransferase.
	2.4.2.8	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase.

- 2.4.2.9 Uracil phosphoribosyltransférase.
- 2.4.2.15 Guanosine phosphorylase.
- 2.4.2.23 Deoxyuridine phosphorylase.
- 2.4.2.28 5'-methylthioadenosine phosphorylase.

5

Bien entendu, d'autres enzymes, notamment les enzymes du métabolisme ou du catabolisme, peuvent faire l'objet d'une évolution grâce au procédé selon l'invention. Ces enzymes et leur numéro EC respectif sont répertoriés par le Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) à l'adresse

10 suivante : <http://expasy.proteome.org.au/enzyme/>

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention se rapporte à un procédé tel que défini ci-dessus dans lequel la protéine X a la propriété d'introduire des mutations dans l'ADN. La propriété de mutateur conditionnel de la protéine X en présence

15

d'analogues de nucléosides promutagènes permet de soumettre son propre gène à un épisode de mutagenèse *in vivo*.

En ce sens, le procédé selon l'invention permet de faire évoluer une kinase X de sorte à en modifier ses caractéristiques, ledit procédé comprenant les étapes

20

- a) obtention de cellules comportant un génotype [kinaseY* :kinaseX+], par transformation d'une cellule [kinaseY+] avec un acide nucléique comprenant le gène codant pour la kinase X, Y* signifiant que le gène codant pour Y a été inactivé, Y étant une kinase appartenant à une classe voisine de X montrant une

25

activité voisine, les classes de X et Y se caractérisant en ce qu'elles possèdent au moins les trois premiers chiffres appartenant aux classes EC 2.7.1.- de la nomenclature internationale à 4 chiffres, lesdites cellules présentant un phénotype auxotrophe nécessitant pour survivre l'apport du produit de la réaction de Y sur son substrat dans le milieu de culture ;

- b) exposer les cellules obtenues à l'étape a) à un analogue de nucléosides promutagènes pendant un temps donné, la kinase X étant capable de phosphoryler ledit analogue,
- c) mettre en culture lesdites cellules dans un milieu comprenant le substrat de Y, le produit de la réaction dudit substrat avec Y étant nécessaire à la survie de ladite cellule,
- d) sélectionner les cellules qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles la kinase X, modifiée par l'action dudit analogue de nucléoside promutagène, complémente la déficience en la kinase Y.
- 10 Par « complément », on entend la suppression du phénotype auxotrophe résultant de l'inactivation du gène Y.

Lesdites cellules sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, de préférence *E. coli*. Dans le cas où la protéine X est une kinase, le substrat est sélectionné parmi les nucléosides et leurs analogues.

Avantageusement, la kinase X est une déoxycytidine kinase appartenant à la classe EC 2.7.1.74. La kinase Y est de préférence une kinase n'appartenant pas à EC 2.7.1.74, notamment une thymidine kinase (TDK) appartenant à la classe EC 2.7.1.21. Dans la mesure où X est une phosphorylase ou une polymérase, Y est une phosphorylase ou une polymérase différente de X.

Ainsi, le procédé évoqué ci-dessus peut comprendre les étapes suivantes :

- a) obtention d'une bactérie *E. coli* $\Delta deo tdk p::dckH+$,
mise en culture des cellules obtenues à l'étape a) dans un milieu comprenant :
- 25 - un agent mutagène sélectionné parmi les analogues de nucléosides promutagènes et du triméthoprine qui bloque la synthèse du thymidylate par la thymidylate synthase ;
- et la thymidine qui est nécessaire à la survie de ladite cellule,
- b) sélection des cellules qui ont survécu à l'étape b) dans lesquelles la DCKH, modifiée par l'action dudit analogue promutagène, complémente la déficience en
- 30 TDK.

Avantageusement, la kinase X est une désoxycytidine kinase, notamment la DCK1 humaine de séquence déposée dans GENBANK sous le numéro d'accèsion M60527 comportant au moins une mutation sélectionnée parmi les mutations D133E et R104Q. La séquence double mutante de DCK1 (SEQ ID No1) est :

5

```

1  MATPPKRSCP   SFSASSEGTR   IKKISIEGNI   AAGKSTFVNI
   LKQLCEDWEV VPEPVARWCN
61  VQSTQDEFEE   LTMSQKNGGN   VLQMMYEKPE   RWSFTFQTYA
   CLSRIRAQLA SLNGKLKDAE
10 121 KPVLFERSV    YSDRYIFASN   LYESECMNET   EWTIYQDWHD
   WMNNQFGQSL ELDGIIYLQA
   181 TPETCLHRIY   LRGRNEEQGI   PLEYLEKLHY   KHESWLLHRT
   LKTNFDYLQE VPILTLDVNE
   241 DFKDKYESLV  EKVKEFLSTL

```

15

En outre, la kinase X est de préférence capable d'activer un analogue de nucléoside promutagène, lequel analogue introduit des mutations dans son propre gène.

A l'issue du procédé, la kinase X mutée est capable de remplacer (complémentation) la kinase Y et présente donc une activité élargie par rapport à son activité initiale.

20

Ainsi, dans un deuxième aspect, l'invention vise une protéine X mutée, notamment une kinase X mutée, susceptible d'être obtenue à partir du procédé décrit ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle présente une activité élargie par rapport à la protéine X initiale (ou à la kinase X initiale). Il peut s'agir par exemple de la kinase DCK1 humaine mentionnée ci-dessus comportant au moins une mutation sélectionnée parmi les mutations D133E et R104Q. L'invention porte également sur un acide nucléique comprenant une séquence codant pour la kinase DCK1 humaine telle que définie ci-dessus et un vecteur comprenant cette séquence codante, ladite séquence pouvant être fusionnée à un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes et/ou procaryotes.

25

De préférence, le vecteur est un plasmide qui peut être introduit dans une bactérie telle que par exemple *E. coli* par transformation ; le vecteur se maintient dans la bactérie de manière stable ou transitoire.

5 L'invention porte également sur une cellule hôte comprenant un vecteur exposé ci-dessus.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'une kinase, explicitée précédemment, dans un procédé tel que défini ci-dessus pour rendre actif un analogue de nucléoside promutagène. Plus généralement, l'invention vise
10 l'utilisation d'une kinase mentionnée ci-dessus dans tout procédé d'hypermutagenèse, pour convertir des nucléosides, naturellement réfractaires à la phosphorylation enzymatique, en leur dérivé 5' phosphate respectif.

L'invention porte également sur l'utilisation concomitante d'une kinase selon l'une des revendications 12 et 13 et d'autres enzymes tels que AMK et/ou la
15 transdesoxyribosylase (NTD) pour élargir *in vivo* la gamme de la mutagenèse à l'aide de promutagènes.

En outre, il faut signaler que le vecteur mentionné ci-dessus peut être utilisé pour la préparation d'un médicament destiné à la thérapie génique pour permettre
20 l'incorporation d'analogues de nucléosides dans l'ADN.

L'invention vise également un procédé de mutagenèse *in vivo* d'une séquence d'ADN déterminée, ladite séquence d'ADN étant dans une cellule, comprenant les étapes consistant à :

- 25
- effectuer la mutation par insertion d'au moins un type de nucléosides promutagènes dans ladite séquence, la cellule exprimant au moins un système enzymatique permettant l'insertion dudit nucléotide promutagène dans l'ADN,
 - et détecter la présence de la séquence mutée,
- caractérisé en ce que le système enzymatique comprend une kinase telle que définie
30 ci-dessus.

Ce procédé permet de faire évoluer une protéine spécifique de la cellule. En ce sens, on inactive un gène codant pour une protéine apparentée à ladite protéine spécifique, la protéine apparentée étant nécessaire à la survie de la cellule, et on détecte la complémentation après mutation du gène codant pour ladite protéine spécifique.

- 5 Ladite protéine spécifique et ladite protéine apparentée sont de préférence des enzymes appartenant à une classe voisine ayant en commun au moins les trois premiers chiffres de la nomenclature internationale EC à 4 chiffres.

Ces protéines sont sélectionnées parmi les kinases appartenant aux classes EC 2.7.1. : on peut également envisager les nucléotidyl transférases appartenant aux classes EC

- 10 2.7.7. -notamment les polymérases, et les phosphorylases appartenant aux classes EC 2.4.2.- en utilisant des cribles appropriés. Avantageusement, lesdites protéines ont la propriété de pouvoir faire évoluer leur propre gène.

- L'invention porte également sur la souche d'*E. coli* B 7151 de génotype Δ deo *tdk* 15 comprenant un vecteur exprimant la DCK mutée D133E déposée le 21 février 2001 à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France) sous le numéro d'accèsion I-2631.

- L'invention porte également sur une souche d'*E. coli* B 7134 de génotype Δ deo *tdk* 20 comprenant un vecteur exprimant la DCK humaine déposée le 21 février 2001 à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-2630.

L'invention porte également sur une souche d'*E. coli* β 7338 de génotype Δ deo *tdk* comprenant un vecteur exprimant la DCK double mutante D133E et R104Q déposée le 27 mars 2001 à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-2650.

25 Légendes

Figure 1: crible permettant la sélection d'une activité thymidine kinase chez *Escherichia coli*.

Figure 2: spécificités comparées de la thymidine kinase d'*Escherichia coli* et de la désoxycytidine kinase humaine.

Figure 3: exemples d'analogues de nucléosides

5

Matériels et méthodes

Composés chimiques : les composés 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), 2'-désoxyinosine (dI), N4-amino-2'-désoxycytidine (désoxyribonucléoside de la 2-hydroxy-4-hydrazino-pyrimidine, désigné 4am'dC), 5-aza-2'-désoxycytidine (5azadC), 5-iodo-2'-désoxycytidine (5IdC), 5-bromo-2'-désoxycytidine (5BrdC) and 5-methyl-2'-désoxycytidine (5MedC) ont été achetés chez Sigma. La 2-désoxy-iso-adénosine (disoA) (2-amino-9-(2'-désoxy- β -D-ribofuranosyl)purine) a été préparée par transglycosylation enzymatique en utilisant un extrait brut de N-deoxyribosyltransferases de *Lactobacillus leichmannii*. La synthèse de la 2'-désoxyisoguanosine (2-hydroxy-6-amino-9-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)purine) a été réalisée par fermeture du cycle du 5-amino-1-(2'-désoxy- β -D-ribofuranosyl)imidazole-4-carboxamide. La préparation du 1-(2'-désoxyribofuramosyl)-imidazole-4-carboxamide (dY) a été décrite dans Pochet et al, 1995.

Culture des souches bactériennes : les bactéries ont été cultivées dans un milieu riche Luria-Bertani (LB) ou dans un milieu minimum supplémenté avec 2g/l de glucose (MS). Les mêmes milieux de croissance ont été solidifiés avec 15g/l d'agar (Difco) pour la préparation des boîtes de Pétri. Les cultures liquides et solides ont été incubées à 37°C. Dans certains cas, des antibiotiques ont été rajoutés aux concentrations suivantes : 100mg/l de carbenicilline, 25mg/l de kanamycine, 15mg/l de tétracycline. Le triméthoprime a été utilisé à une concentration de 100 mg/l dans un milieu LB supplémenté avec 0,3 mM de thymidine. Pour l'induction de l'expression du gène, l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) a été rajouté à 0,5 mM.

Souches et constructions plasmidiques : la liste des souches *E. coli* K12 utilisées et les plasmides construits dans le cadre de la présente invention est donnée dans le tableau 1 ci-après.

5

Tableau 1 : souches bactériennes et plasmides

	Souche	Phénotype	Construction
10	MG1655	F ⁻ λ ⁻	B. Bachmann
	KU8	<i>trxB::Tn10Kan ΔserB zjj::Tn10</i>	Uhland et al.
	SØ928	<i>Δdeo Δlac thi upp udp ton</i>	P. Nygaard
	SØ5110	<i>cdd::Tn10</i>	P. Nygaard
	CC101	<i>ara Δ(lac proB)13</i>	Cupples and Miller
15		F' <i>lacZ::Glu461am proB</i> ⁺	
	CC102	<i>ara Δ(lac proB)13</i>	Cupples and Miller
		F' <i>lacZ::Glu461Gly proB</i> ⁺	
	CC103	<i>ara Δ(lac proB)13</i>	Cupples and Miller
		F' <i>lacZ::Glu461Gln proB</i> ⁺	
20	CC104	<i>ara Δ(lac proB)13</i>	Cupples and Miller
		F' <i>lacZ::Glu461Ala proB</i> ⁺	
	CC105	<i>ara Δ(lac proB)13</i>	Cupples and Miller
		F' <i>lacZ::Glu461Val proB</i> ⁺	
	CC106	<i>ara Δ(lac proB)13</i>	Cupples and Miller
25		F' <i>lacZ::Glu461Lys proB</i> ⁺	
	B7069	<i>tdk</i>	Mutant MG1655 (résistance spontanée à l'AZT)
	B7117	<i>Δdeo tdk</i>	Transductions séquentielles de B7069 avec des lysats P1 de KU8 et SØ928
30	β 7134	<i>Δdeo tdk</i> pDCK1(<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> ⁺)	Transformation de B7117
	β7151	<i>Δdeo tdk</i>	Plasmide pDCK D133E
	B7320	<i>Δdeo tdk cdd::Tn10</i>	Transduction de B7117 avec

			le lysat P1 de SØ5110
	B7334	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUTrc ($kan^+ lacI^Q$)	Transformation de B7320
	B7335	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK1 ($kan^+ lacI^Q dck^+$)	Transformation de B7320
5	B7336	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK2 ($kan^+ lacI^Q dck::D133E$)	Transformation de B7320
	B7337	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK3 ($kan^+ lacI^Q dck::R104Q$)	Transformation de B7320
10	B7338	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK4 ($kan^+ lacI^Q dck::D133E-R104Q$)	Transformation de B7320
	B7339	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUTrc ($kan^+ lacI^Q$) pAK1 ($bla^+ lacI^Q adk^+$)	Double transformation de B7320
15	B7340	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK1 ($kan^+ lacI^Q dck^+$) pAK1 ($bla^+ lacI^Q adk^+$)	Double transformation de B7320
	B7341	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK2 ($kan^+ lacI^Q dck::D133E$) pAK1 ($bla^+ lacI^Q adk^+$)	Transformation de B7336
20	B7342	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK3 ($kan^+ lacI^Q dck::R104Q$) pAK1 ($bla^+ lacI^Q adk^+$)	Double transformation de B7320
	B7343	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK4 ($kan^+ lacI^Q dck::D133E-R104Q$) pAK1 ($bla^+ lacI^Q adk^+$)	Double transformation de B7320
25	B7344	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUTrc ($kan^+ lacI^Q$) pAKT39A ($bla^+ lacI^Q adk::T39A$)	Double transformation de B7320
30	B7345	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK1 ($kan^+ lacI^Q dck^+$) pAKT39A ($bla^+ lacI^Q adk::T39A$)	Double transformation de B7320
	B7346	$\Delta deo tdk cdd::Tn10$ pSUDCK2 ($kan^+ lacI^Q dck::D133E$) pAKT39A ($bla^+ lacI^Q adk::T39A$)	Double transformation de B7320
35			

	B7347	<i>Δdeo tdk cdd::Tn10</i> pSUDCK3 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::R104Q</i>) pAKT39A (<i>bla⁺ lacI^Q adk::T39A</i>)	Double transformation de B7320
5	B7348	<i>Δdeo tdk cdd::Tn10</i> pSUDCK4 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E-R104Q</i>) pAKT39A (<i>bla⁺ lacI^Q adk::T39A</i>)	Double transformation de B7320
	B7351	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461am proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Transformation de CC101
10	B7352	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Gly proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Transformation de CC102
	B7353	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Gln proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Transformation de CC103
15	B7354	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Ala proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Transformation de CC104
	B7355	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Val proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Transformation de CC105
20	B7356	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Lys proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Transformation de CC106
25	B7357	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461am proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>) pAK1 (<i>bla⁺ lacI^Q adk⁺</i>)	Double transformation de CC101
30	B7358	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Gly proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>) pAK1 (<i>bla⁺ lacI^Q adk⁺</i>)	Double transformation de CC102
	B7359	<i>ara Δ(lac proB)13</i> F' <i>lacZ::Glu461Gln proB⁺</i> pSUDCK2 (<i>kan⁺ lacI^Q dck::D133E</i>)	Double transformation de CC103
35			

		pAK1 (<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>adk</i> ⁺)	
	B7360	<i>ara</i> Δ(<i>lac proB</i>)13	Double transformation de CC104
		F' <i>lacZ</i> :Glu461Ala <i>proB</i> ⁺	
		pSUDCK2 (<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :D133E)	
5		pAK1 (<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>adk</i> ⁺)	
	B7361	<i>ara</i> Δ(<i>lac proB</i>)13	Double transformation de CC105
		F' <i>lacZ</i> :Glu461Val <i>proB</i> ⁺	
		pSUDCK2 (<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :D133E)	
		pAK1 (<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>adk</i> ⁺)	
10	B7362	<i>ara</i> Δ(<i>lac proB</i>)13	Double transformation de CC106
		F' <i>lacZ</i> :Glu461Lys <i>proB</i> ⁺	
		pSUDCK2 (<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :D133E)	
		pAK1 (<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>adk</i> ⁺)	
<hr/>			
15	Plasmides		
<hr/>			
	pTrc99A	<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q	ColE1 réplicon (Pharmacia)
20	pDCK1	<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> ⁺	Bouzon & Marlière
	pDCK2	<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :D133E	Mutagenèse <i>In vivo</i> / disoG de B7134
	pDCK3	<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :R104Q	Mutagenèse <i>In vivo</i> / disoA de B7134
25	pDCK4	<i>bla</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :D133E-R104Q	Substitution d'un fragment <i>SacI</i> - <i>Bam</i> HI de 466 bases de pDCK3 par celui de pDCK2
	pSUTrc	<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q	Clonage du fragment <i>SphI</i> - <i>Bam</i> HI de pTrc99A dans pSU39
30	pSUDCK1	<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> ⁺	Clonage du fragment <i>SphI</i> - <i>Bam</i> HI de pDCK1 dans pSU39
	pSUDCK2	<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :D133E	Clonage du fragment <i>SphI</i> - <i>Bam</i> HI de pDCK2 dans pSU39
	pSUDCK3	<i>kan</i> ⁺ <i>lacI</i> ^Q <i>dck</i> :R104Q	Clonage du fragment <i>SphI</i> - <i>Bam</i> HI de pDCK3 dans pSU39
35			

pSUDCK4	<i>kan⁺ lacI^Q dck:D133E-R104Q</i>	Clonage du fragment <i>SphI</i> - <i>BamHI</i> de pDCK4 dans pSU39
pAK1	<i>bla⁺ lacI^Q adk⁺</i>	Dr T. Okajima
pAKT39A	<i>bla⁺ lacI^Q adk:T39A</i>	Dr. T. Okajima

5

La souche B7069 a été sélectionnée comme étant un mutant spontané résistant à l'AZT de MG1655 cultivée sur boîte LB supplémentée avec 30 µM d'AZT. Le phénotype *tdk* a été déterminé par l'absence de croissance sur milieu riche Mueller-Hinton (MH) comprenant du triméthoprim et de la thymidine. On a contrôlé que la mutation B7069 *tdk* ne réverse pas spontanément en repiquant les cellules sur le milieu MH supplémenté avec du triméthoprim et de la thymidine après 20 générations en LB. La souche B7117 *Δdeo tdk* a été obtenue après deux transductions P1 consécutives. Les bactéries B7069 ont d'abord été infectées avec le lysat P1 provenant de KU8 dans le but de transférer la délétion *ΔserB* et le marqueur proximal *Tn10*. Les clones résistants à la tétracycline ont été sélectionnés et testés pour leur auxotrophie à la sérine. Un de ces clones a ensuite été infecté avec le lysat P1 provenant de SØ928 et les prototrophes à la sérine ont été sélectionnés sur milieu minimum. Tous les transductants *Ser⁺* sélectionnés comportent la délétion de l'opéron *deo* car ils sont incapables de croître en milieu minimum avec de la thymidine comme seule source de carbone. Le plasmide pDCK4 a été construit en substituant le fragment *SacI*-*BamHI* de 466 bases de long de pDCK3 par celui de pDCK2. La présence des mutations D133E et R104Q sur pDCK4 a été déterminée par séquençage.

25

Sélection *in vivo* des mutants DCK : une culture de 12 heures des cellules B7134 en milieu MS supplémenté avec 50 mg/l de carbenicilline a été diluée 100 fois dans le même milieu et cultivée en aération jusqu'au moment où une turbidité de 0,100 (600nm) soit atteinte. La culture a ensuite été diluée 25 fois dans le même milieu avec ou sans IPTG et supplémentée avec des concentrations variables (5 à 30µM) des analogues de nucléosides promutagéniques *disoG* et *disoA* puis cultivée en

30

aération pendant 18 heures. Les cellules ont été rincées puis étalées sur des boîtes MH supplémentées avec du triméthoprine, de la thymidine et de l'IPTG. Des colonies sont apparues après 36 heures d'incubation à 37°C. Aucune colonie n'a été obtenue en l'absence d'analogue de nucléoside.

5

Test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : la CMI des analogues de nucléosides a été déterminée conformément aux méthodes classiques avec les modifications suivantes : une culture bactérienne de 12 heures en milieu MS avec les antibiotiques appropriés a été diluée 100 fois dans le même milieu et cultivée à 37°C en aération jusqu'à l'obtention d'une turbidité d'environ 0,1 OD. (600nm). La culture a ensuite été diluée 100 fois dans le même milieu
10 supplémenté avec IPTG et distribuée sur microplaque 96 puits dans un volume final de 100 µl dans une série de dilutions de 2 en 2 d'analogues de nucléotide. Chaque analogue a été testé deux fois. Après une incubation pendant 18 heures à 37°C avec
15 agitation, le CMI a été déterminé comme correspondant à la concentration la plus faible en analogue pour laquelle aucune turbidité n'est détectable.

Test de réversion : Des cellules des souches lac CC101 à CC106 ont été transformées, soit avec le plasmide pSUDCK2 seul, soit avec les plasmides
20 pSUDCK2 et pAK1. Les transformations ont été cultivées pendant 12 heures en milieu minimum comprenant 0,2% de glucose avec les antibiotiques appropriés pour la maintenance des plasmides. La culture a ensuite été diluée 100 fois dans le même milieu et cultivée jusqu'à l'apparition d'une DO de 0,1 (600nm). Ensuite, les cultures ont été diluées 100 fois dans le même milieu supplémenté avec 0,5 mM IPTG puis
25 diluées 10 fois avec une solution 10 fois concentrée de l'analogue de nucléoside à tester. Les cellules ont été cultivées pendant 18 heures à 37°C avant la mise en culture sur boîte. Le dénombrement des cellules viables a été réalisé sur milieu solide LB. Les révertants Lac+ ont été sélectionnés en milieu minimum contenant 0,2% de lactose comme source de carbone. La fréquence de mutation a été définie comme
30 étant le ratio : nombre de cellules mutantes sur nombre de cellules viables. Diverses concentrations finales des analogues nucléosidiques correspondant aux CMI/2,

CMI/4, CMI/10 et CMI/20 ont été testées, car la sensibilité des souches dérivées de celles de Miller vis-à-vis des différents analogues n'est pas identique à celle des souches dérivées de MG1655. La fréquence de mutations a été déterminée en utilisant les cultures obtenues avec la concentration la plus élevée en analogue nucléosidique permettant une croissance visible après 18 heures.

Exemple 1 : crible sélectif

Escherichia coli ne possède pas d'activité désoxynucléoside kinase à l'exception d'une thymidine kinase, codée par le gène *tdk*, très spécifique de la thymidine et de la désoxyuridine. Nous avons montré précédemment comment l'introduction de l'activité désoxycytidine kinase chez *E. coli* ouvre une voie métabolique inexistante dans cet organisme, et permet aux désoxynucléosides naturels et à des analogues structuraux d'accéder au pool des monomères de l'ADN [Bouzon & Marlière, 1997]. Une souche portant un allèle défectif du gène *tdk* ne peut utiliser la thymidine comme source de thymidylate (dTMP) et sa croissance dépend de l'intégrité de la voie de synthèse *de novo* de celui-ci (Figure 1). La synthèse de dTMP à partir de dUMP est catalysée par la thymidylate synthase (gène *thyA*). Elle peut être bloquée par le triméthoprine qui par inhibition de l'activité de la dihydrofolate réductase conduit à l'épuisement du pool intracellulaire du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate, donneur du groupement méthyle dans la réaction. Nous avons d'abord montré qu'une souche dont le gène *tdk* est inactivé ne prolifère pas sur milieu riche en présence de triméthoprine et de thymidine. Ce crible sélectif qui impose le maintien d'une activité thymidine kinase a été mis en œuvre pour faire évoluer l'activité de la désoxycytidine kinase humaine chez *E. coli*. On le trouve schématisé dans la Figure 1.

Exemple 2 : sélection de mutants *dckH* présentant une activité élargie

Nous avons mis à profit la propriété de mutateur conditionnel de DCK en présence d'analogues de nucléosides promutagènes pour soumettre son propre gène *dck* à un épisode de mutagenèse *in vivo*. Ainsi, des bactéries de génotype $\Delta_{deo} tdk p::dckH+$ furent exposées soit à la 2'-désoxy-iso-adénosine (disoA) soit à la 2'-désoxy-iso-

guanosine (disoG), puis incubées sur milieu solide riche en présence de triméthoprimine et de thymidine. Des colonies sont apparues suite à l'administration des deux composés à une fréquence de l'ordre de 10^{-8} . Aucune colonie ne survint en absence de nucléoside promutagène.

5

Le séquençage des gènes de 7 plasmides mutants obtenus indépendamment (4 après mutagénèse par disoG, 3 par disoA) mit en évidence deux mutations ponctuelles D133E et R104Q, chacune conférant l'acquisition de l'activité thymidine kinase par DCK. Ces allèles sont désignés dckH*. Un plasmide réunissant les deux mutations dans un même allèle, dckH**, fut construit et introduit dans la souche B7117 de génotype $\Delta deo tdk$. Il permet la complémentation de la mutation tdk, exprimant donc aussi une activité thymidine kinase. Les différents allèles sélectionnés sont répertoriés dans le Tableau 2 ci-après.

15 **Tableau 2: mutations du gène hétérologue dckH supprimant le phénotype tdk de *Escherichia coli*.**

Mutagène	Mutation détectée	Fréquence	Site de la mutation	substitution acide aminé
disoG	C → A	4/4	codon 133 GAC	Asp → Glu
disoA	C → A	1/3	codon 133 GAC	Asp → Glu
	C → G	1/3	codon 133 GAC	Asp → Glu
	G → A	1/3	codon 104 CGA	Arg → Gln

Les détails de la sélection et de l'analyse génétique sont donnés dans la section Matériels et Méthodes.

20

Exemple 3 : propriétés fonctionnelles des mutants dckH

La toxicité d'analogues de nucléosides, déviant soit par le sucre soit par la base, a été évaluée dans des souches de génotype $\Delta deo tdk cdd$ exprimant sur un plasmide les différents allèles de dckH, allèle sauvage, D133E, R104Q et double mutant.

25

- Le marqueur Δdeo correspond à l'inactivation de l'opéron catabolique des désoxynucléosides et le marqueur *cdd* à l'inactivation de la désoxycytidine désaminase; ces marqueurs évitent que les analogues de nucléosides apportés dans le milieu engendrent des dérivés autres que le dérivé phosphorylé souhaité par action de DCK; ils permettent l'emploi de doses plus faibles des analogues. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 3 ci-après.

Tableau 3: toxicité d'analogues de deoxynucléoside induite par la deoxycytidine kinase sur *Escherichia coli*.

10

Analogue de nucléoside	Souche et allèle dck $\Delta deo tdk cdd::Tn10$				
	B7334 none	B7335 wt	B7336 D133E	B7337 R104Q	B7338 D133E R104Q
ddA	80	80	80	80	80
ddU	>	>	>	>	>
ddT	>	>	>	>	>
ddC	>	>	>	>	>
ddI	80	40	40	20	40
araC	>	160	20	20	320
AZT	>	>	640	640	1280
5'-amino-dT	>	>	>	>	>
disoA	>	>	10	>	>
disoG	>	>	>	>	>
dI	>	>	1.25	>	320
disoI	>	>	>	>	>
8ho'dI (*)	>	>	1280	>	>
DAP	>	>	>	>	>
d-oxanosine	>	>	80	>	>
dY	>	>	>	>	>
dJ	>	>	>	>	>
amino-dC	>	>	20	2.5	20
5-aza-dC	>	1.25	1.25	1.25	1.25
5-iodo-dC	>	>	>	>	>
5-bromo-dC	>	>	>	>	>
5-methyl-dC	>	>	>	>	>
5-methyl-disoC	>	>	>	>	>
5-chloro-dU	>	>	>	>	>
5-bromo-dU	>	>	>	>	>
5-iodo-dU	>	>	>	>	>
5-hm-dU	>	>	>	>	>

(*) désoxyribonucléoside de la 8-hydroxy-hypoxanthine

5 Les concentrations inhibitrices minimales, exprimées en microM, ont été déterminées comme indiqué dans la section Matériels et Méthodes.

Chaque dosage a été effectué trois fois : aucune toxicité n'a pu être détectée à plus haute concentration en analogue, 1,28 mM.

Le génotype détaillé des souches hôtes de chaque allèle est indiqué au Tableau 1.

10 Bien que conduisant toutes deux à l'acceptation de la thymidine comme substrat, les mutations ponctuelles D133E et R104Q ont des effets contrastés sur la phosphorylation des différents analogues testés.

15 Les souches sauvages d'*E. coli* sont sensibles à de faibles concentrations d'AZT, tandis que les souches tdk, qui ont perdu l'activité thymidine kinase, y sont réfractaires [Elwell et al, 1987]. Les tests rapportés dans le Tableau 3 indiquent que l'AZT n'est pas substrat de DCK wt, mais que le mutant D133E active l'analogue de telle façon qu'on détecte une toxicité à haute concentration de l'analogue (CMI= 1280 microM). Il est probable que cette toxicité provient de l'incorporation de l'AZT triphosphate par l'ADN polymérase et le blocage de l'élongation par ce terminateur
20 de chaîne après les actions successives de la dTMP kinase et de la nucléoside diphosphokinase sur l'AZT monophosphate.

Poursuivant l'analyse des résultats du Tableau 3, la mutation D133E entraîne une
25 forte toxicité de disoA, (CMI= 10 microM). La mutation R104Q n'a pas d'effet vis-à-vis de ce composé. De même, la mutation D133E entraîne une très forte toxicité de la désoxyinosine, dI (CMI= 1 microM). Le désoxyribonucléoside de la 2-hydroxy-4-hydrazino-pyrimidine (désignée 4am'dC) apparaît meilleur substrat du mutant R104Q que du mutant D133E, les deux mutations causant une très forte
30 augmentation de la toxicité de l'analogue. La 5-aza-désoxycytidine (désignée 5azadC) est toxique à très faible concentration (CMI< 1.25 microM) quel que soit l'allèle de DCK.

Globalement, l'allèle dckH-D133E se montre le plus intéressant, augmentant la sensibilité pour le plus grand nombre d'analogues. La combinaison des deux mutations D133E et R104Q mène à un spectre d'activité apparemment intermédiaire
5 entre chacun des deux mutants individuels.

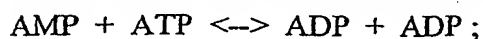
Exemple 4 : diversification métabolique par coexpression de gènes hétérologues

L'absence d'effet toxique par un analogue de nucléoside vis-à-vis d'une souche d'*E. coli* exprimant le gène dckH ou l'un de ses allèles mutants peut avoir plusieurs
10 raisons, si on suppose que tout effet toxique résulte de l'incorporation de monomères erronés dans les chaînes d'ADN : (i) l'analogue n'est pas substrat ou est un mauvais substrat de l'enzyme DCK; (ii) l'analogue est phosphorylé en monophosphate par DCK mais les étapes ultérieures de phosphorylation en diphosphate puis en triphosphate échouent; (iii) l'analogue triphosphate n'est pas substrat de l'ADN
15 polymérase.

Il est connu que les nucléoside monophosphate kinases, qui produisent les diphosphates à partir des triphosphates acceptent le ribose et le désoxyribose, mais sont très spécifiques de la base. On s'attendait donc à ce que la coproduction d'un
20 enzyme formant une variété élargie de monophosphates (allèles mutés DCK) et d'un enzyme formant une variété élargie de diphosphates dans la même cellule d'*E. coli* révèle les substrats nucléosidiques portant des bases déviantes susceptibles d'être phosphorylés en monophosphates par DCK wt ou DCK muté mais dont la conversion en diphosphate ne puisse être catalysée par les enzymes d'*E. coli*.

25

L'adénosine monophosphate kinase des eucaryotes (AMK) présente une parenté de structure avec les UMP/CMP kinases des bactéries [Okajima et al, 1993]. Sa fonction physiologique serait de catalyser l'échange de phosphate entre AMP et ATP:



30 l'enzyme agit également sur un substrat portant le désoxyribose:



Le mutant T39A du gène de l'enzyme du poulet (amkG*) a été construit par mutagenèse dirigée en se guidant sur des comparaisons de séquence, par un groupe au Japon [Okajima et al, 1993]. In vitro, l'activité de AMK sur CMP est inférieure à 1 % de son activité sur AMP. La mutation T39A modifie le spectre d'activité de l'enzyme et augmente significativement la conversion de CMP et UMP [Okajima et al, 1993].

Nous avons exprimé conjointement dans le contexte génétique $\Delta deo tdk cdd$ chacun des quatre allèles de dckH avec chacun des deux allèles wt et T39A de amkG, et testé la toxicité des différents analogues de nucléosides déjà testés précédemment (Tableau 4 ci-après).

Tableau 4: toxicité d'analogues de deoxynucléoside induite par la coexpression de la deoxycytidine kinase and de l'adenosine monophosphate kinase dans *Escherichia coli*.

Analogue de Nucléoside	Strain									
	dckH allele amkG allele									
	B7339	B7340	B7341	B7342	B7343	B7344	B7345	B7346	B7347	B7348
	none	wt	D133 E	R104 Q	D133E R104Q	none	wt	D133 E	R104 Q	D133E R104Q
	wt	wt	wt	wt	wt	T39A	T39A	T39A	T39A	T39A
AZT	>	>	>	>	>	>	>	1280	>	>
disoA	>	>	5	>	1280	>	>	10	>	>
disoG	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>
dI	>	>	≤1.25	>	1280	>	>	≤1.25	>	1280
8oxodI	>	>	1280	>	>	>	>	1280	>	>
dY	>	>	>	>	>	>	>	1280	>	>
4am'dC	>	>	80	≤1.25	80	>	>	640	5	320
5azadC	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	≤1.25	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	≤1.25
5IdC	>	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	≤1.25
5BrdC	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	≤1.25	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	≤1.25
5MedC	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	5	>	≤1.25	≤1.25	≤1.25	≤1.25

Les concentrations inhibitrices minimum, exprimées en microM, ont été déterminées comme indiqué dans la section Matériels and méthodes.

Chaque expérience a été effectuée trois fois : aucune toxicité n'a pu être détectée à plus haute concentration en analogue, 1280 microM.

Le génotype détaillé des souches hôtes de chaque allèle est indiqué au Tableau 3.

- 5 Il est apparu que la coexpression des deux gènes eucaryotes entraîne la conversion métabolique des dérivés 5-halogénés (5BrdC, 5IdC) et 5-méthylé (5MedC) de la désoxycytidine dC en dérivés inhibiteurs pour les bactéries recombinantes, tandis que l'expression d'un seul des deux gènes laisse les bactéries réfractaires aux mêmes analogues. La très grande toxicité de l'analogue lorsqu'il y a expression concomitante
- 10 de DCK et AMK indique que DCK phosphoryle ces substrats mais que c'est l'étape ultérieure de phosphorylation par les monophosphates kinases qui est limitante.

- Comme on le voit dans le Tableau 4, la conjonction de l'allèle DCK-D133E et de l'allèle AMK-T39A entraîne une toxicité des souches d'*E. coli* qui les portent vis-à-
- 15 vis du nucléoside simplifié dY, désoxyribosyl-imidazole-carboxamide [Pochet et al, 1995]. Les effets mutagènes de la base Y avaient été démontrés ex vivo au cours de réactions d'amplification PCR, causant en particulier des transitions A:T->G:C et des transversions A:T->T:A [Sala et al, 1996]. La toxicité de dY à 1 mM vis-à-vis des souches rapportées ici s'accompagne d'une augmentation du même spectre de
- 20 mutations *in vivo*.

REFERENCES

- 5 Bouzon M. & Marliere P. (1997) Human deoxycytidine kinase as a conditional mutator in *Escherichia coli*. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III, Sciences de la Vie. 320(6):427-34
- 10 Brown DG. Visse R. Sandhu G. Davies A. Rizkallah PJ. Melitz C. Summers WC. Sanderson MR. (1995) Crystal structures of the thymidine kinase from herpes simplex virus type-1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir. Nature Structural Biology. 2(10):876-81
- 15 Cazaux C, Tiraby M, Loubiere, Haren L, Klatzmann D & Tiraby G (1998) Phosphorylation and cytotoxicity of therapeutic nucleoside analogues: a comparison of alpha and gamma herpesvirus thymidine kinase suicide genes. Cancer Gene Therapy 5(2):83-91
- 20 Chottiner EG. Shewach DS. Datta NS. Ashcraft E. Gribbin D. Ginsburg D. Fox IH. Mitchell BS. (1991) Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88(4):1531-5
- 25 Datta NS. Shewach DS. Hurley MC. Mitchell BS. Fox IH. (1989) Human T-lymphoblast deoxycytidine kinase: purification and properties. Biochemistry. 28(1):114-23
- 30 Elwell LP et al (1987) Antibacterial activity and mechanism of action of 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U). Antimicrobial Agents & Chemotherapy 31(2):274-80
- Harrison PT. Thompson R. Davison AJ. (1991) Evolution of herpesvirus thymidine kinases from cellular deoxycytidine kinase. Journal of General Virology. 72:2583-6

Johansson M, Van Rompay AR, Degrevé B, Balzarini J & Karlsson A (1999) Cloning and characterization of the multisubstrate deoxyribonucleoside kinase of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 274:23814-23819

5

Mullen CA (1994) Metabolic suicide genes in gene therapy. [Review] *Pharmacology & Therapeutics* 63(2):199-207

10

Okajima T, Tanizawa K, Fukui T. (1993) Site-directed mutagenesis of AMP-binding residues in adenylate kinase. *FEBS Letters*. 334(1):86-8

Pochet S., Dugué L., Meier A. & Marlière P. (1995) "Enzymatic synthesis of 1-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-imidazole-4-carboxamide, a simplified DNA building block" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5, 1679-1684.

15

Sala M., Pezo V., Pochet S. & Wain-Hobson S. (1996) "Ambiguous base pairing of the purine analogue 1-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-imidazole-4-carboxamide during PCR" *Nucleic Acids Research* 24, 3302-3306.

20

REVENDICATIONS

1. Procédé pour faire évoluer une protéine X de sorte à en modifier ses caractéristiques comprenant les étapes suivantes :
 - 5 a) obtention de cellules comportant un génotype [protéine Y* : :protéine X+], par transformation de cellules [protéine Y*] avec un acide nucléique comprenant le gène codant pour la protéine X, Y* signifiant que le gène codant pour Y a été inactivé, Y étant une protéine appartenant à une classe voisine de X possédant une activité voisine, les classes de X et Y se caractérisant en ce qu'elles possèdent au moins les
 - 10 trois premiers chiffres appartenant aux classes EC de la nomenclature internationale à 4 chiffres, lesdites cellules présentant un phénotype auxotrophe nécessitant pour survivre l'apport du produit de la réaction de Y sur son substrat dans le milieu de culture ;
 - b) exposer les cellules obtenues à l'étape a) à un mutagène,
 - 15 c) mettre en culture lesdites cellules dans un milieu comprenant le substrat de Y, le produit de la réaction de Y sur son substrat étant nécessaire à la survie de ladite cellule,
 - d) sélectionner les cellules qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles la protéine X, modifiée par l'action dudit analogue nucléoside promutagène, complémente la
 - 20 déficience en la protéine Y.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la protéine X est sélectionnée parmi les kinases appartenant aux classes EC 2.7.1.-, les nucléotidyl transférases appartenant aux classes EC 2.7.7.-, notamment les polymérases et les
- 25 phosphorylases appartenant aux classes EC 2.4.2.-.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que la protéine X est capable d'activer un analogue de nucléosides promutagène, lequel analogue introduit des mutations dans son propre gène.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 pour faire évoluer une kinase X de sorte à en modifier ses caractéristiques caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) obtention de cellules comportant un génotype [kinaseY* :kinaseX+], par transformation d'une cellule [kinaseY*] avec un acide nucléique comprenant le gène codant pour la kinase X, Y* signifiant que le gène codant pour Y a été inactivé, Y étant une kinase appartenant à une classe voisine de X montrant une activité voisine, les classes de X et Y se caractérisant en ce qu'elles possèdent au moins les trois premiers chiffres appartenant aux classes EC 2.7.1.- de la nomenclature
10 internationale à 4 chiffres, lesdites cellules présentant un phénotype auxotrophe nécessitant pour survivre l'apport du produit de la réaction de Y sur son substrat dans le milieu de culture ;
- b) exposer les cellules obtenues à l'étape a) à un analogue de nucléosides promutagènes pendant un temps donné, la kinase X étant capable de phosphoryler
15 ledit analogue,
- c) mettre en culture lesdites cellules dans un milieu comprenant le substrat de Y, le produit de la réaction de Y sur son substrat étant nécessaire à la survie de ladite cellule,
- d) sélectionner les cellules qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles la kinase X,
20 modifiée par l'action dudit agent mutagène, complémente la déficience en la kinase Y.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que lesdites cellules
25 sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, de préférence *E. coli*.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que ledit substrat est sélectionné parmi les nucléosides et leurs analogues.

7. Procédé selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisé en ce que la kinase X est
30 une déoxycytidine kinase (DCK) appartenant à la classe EC 2.7.1.74.

8. Procédé selon l'une des revendications 4 à 7 caractérisé en ce que la kinase Y est une thymidine kinase (TDK) appartenant à la classe EC 2.7.1.21.
- 5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) obtention d'une bactérie *E. coli* Δ deo tdk p::dckH⁺,
mise en culture des cellules obtenues à l'étape a) dans un milieu comprenant :
- 10 - un agent mutagène sélectionné parmi les analogues de nucléosides promutagènes et du triméthoprimine qui bloque la synthèse du thymidylate par la thymidylate synthase ;
- et de la thymidine qui est nécessaire à la survie de ladite cellule,
- b) sélection des cellules qui ont survécu à l'étape b) dans lesquelles la DCKH, modifiée par l'action dudit analogue promutagène, complémente la déficience en TDK.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 4 à 9 caractérisé en ce que la kinase X est une désoxycytidine kinase, de préférence la DCK1 humaine possédant la séquence déposée dans GENBANK sous le numéro d'accèsion M60527 comportant au moins une mutation sélectionnée parmi les mutations D133E et R104Q.
- 20 11. Protéine X mutée susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisée en ce qu'elle présente une activité élargie par rapport à la Protéine X initiale.
- 25 12. Kinase X mutée susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisée en ce qu'elle présente une activité élargie par rapport à la kinase X initiale.
- 30 13. Kinase selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'il s'agit de la DCK1 humaine possédant la séquence déposée dans GENBANK sous le numéro

d'accession M60527 comportant au moins une mutation sélectionnée parmi les mutations D133E et R104Q.

5 14. Acide nucléique comprenant la séquence codante pour la kinase selon la revendication 13.

15. Vecteur d'expression comprenant la séquence codante pour la kinase selon la revendication 13.

10 16. Vecteur selon la revendication 15 caractérisé en ce que ladite séquence est fusionnée à un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes et/ou procaryotes.

17. Vecteur selon l'une des revendications 15 et 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide capable de transformer et de se maintenir chez *E. coli*.

15 18. Cellule hôte comprenant un vecteur selon l'une des revendications 15 à 17.

19. Utilisation d'une kinase selon l'une des revendications 12 et 13 dans un procédé selon l'une des revendications 1 à 10 pour l'activation dudit analogue promutagène.

20 20. Utilisation d'une kinase selon l'une des revendications 12 et 13 dans un procédé d'hypermotagenèse.

25 21. Utilisation d'une kinase selon l'une des revendications 12 et 13 pour convertir des nucléosides, naturellement réfractaires à la phosphorylation enzymatique, en leur dérivé 5' phosphate respectif.

30 22. Utilisation concomitante d'une kinase selon l'une des revendications 12 et 13 et d'autres enzymes tels que AMK et/ou la transdesoxyribosylase (NTD) pour élargir in vivo la gamme de la mutagenèse à l'aide de promutagènes.

23. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 15 à 17 pour la préparation d'un médicament destiné à la thérapie génique pour permettre l'incorporation d'analogues de nucléosides dans l'ADN.

5

24. Procédé de mutagenèse *in vivo* d'une séquence d'ADN déterminée, ladite séquence d'ADN étant dans une cellule, comprenant les étapes consistant à :

- effectuer la mutation par insertion d'au moins un type de nucléosides promutagènes dans ladite séquence, la cellule exprimant au moins un système enzymatique permettant l'insertion dudit nucléotide promutagène dans l'ADN,
 - et détecter la présence de la séquence mutée,
- caractérisé en ce que le système enzymatique comprend une kinase selon l'une des revendications 12 et 13.

15 25. Procédé selon la revendication 22 pour faire évoluer une protéine spécifique, ladite protéine étant exprimé de la cellule, caractérisé en ce qu'on inactive un gène codant pour une protéine apparentée à ladite protéine spécifique, la protéine apparentée étant nécessaire à la survie de la cellule, et on détecte la complémentation après mutation du gène codant pour ladite protéine spécifique.

20

26. Procédé selon la revendication 25 caractérisé en que ladite protéine spécifique et ladite protéine apparentée sont des enzymes appartenant à une classe voisine ayant en commun au moins les trois premiers chiffres de la nomenclature internationale EC à 4 chiffres.

25

27. Procédé selon la revendication 26 caractérisé en que lesdites protéines ont la propriété de pouvoir faire évoluer leur propre gène.

28. Souche d'*E. coli* β 7151 de génotype Δ deo *tdk* comprenant un vecteur exprimant la DCK mutée D133E déposée à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-2631.

30

29. Souche d'*E. coli* B 7134 de génotype $\Delta deo tdk$ comprenant un vecteur exprimant la DCK humaine déposée à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-2630.
30. Souche d'*E. coli* β 7338 de génotype $\Delta deo tdk$ comprenant un vecteur exprimant la DCK double mutante D133E et R104Q déposée à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-2650.
- 5

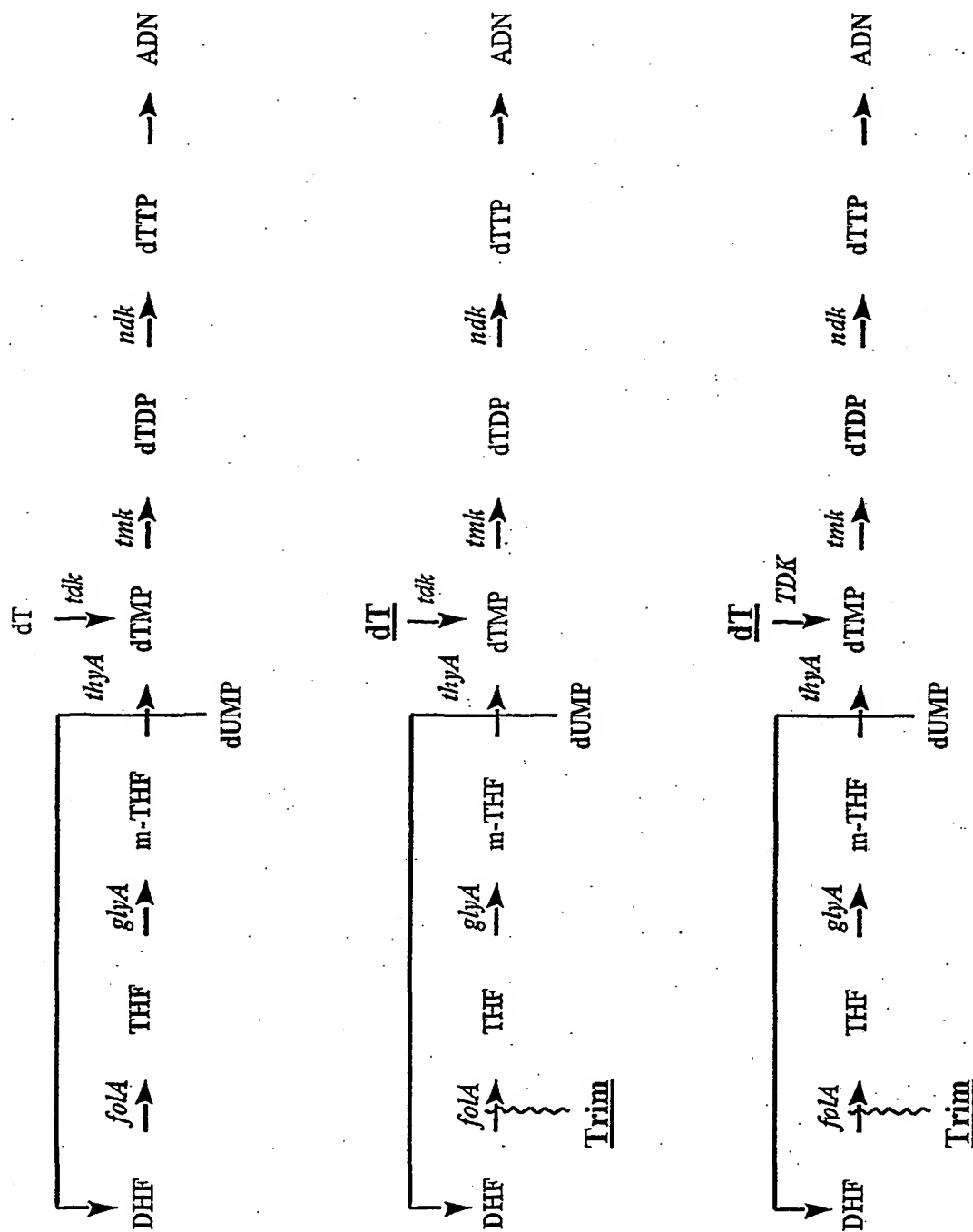


FIGURE 1

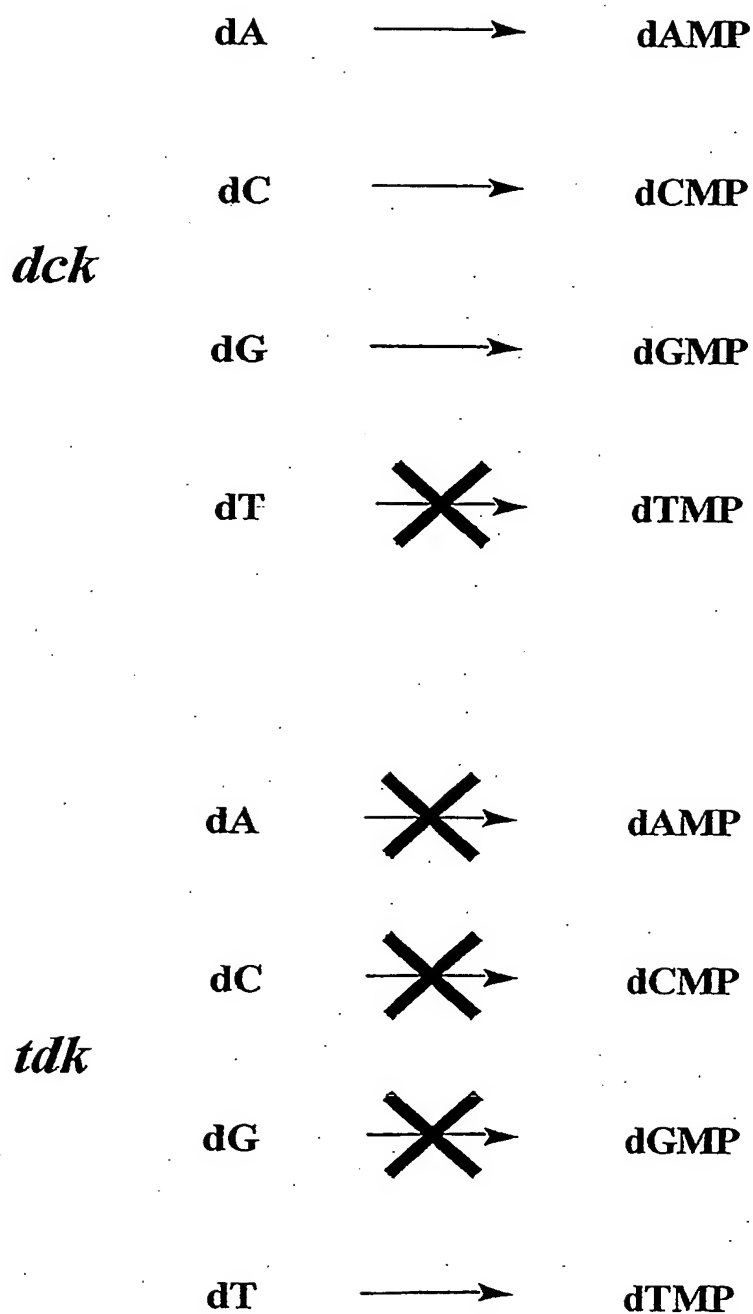
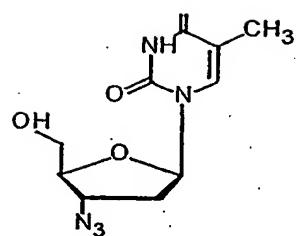
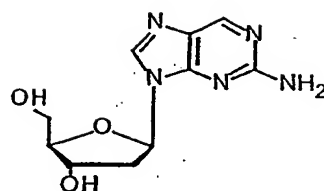


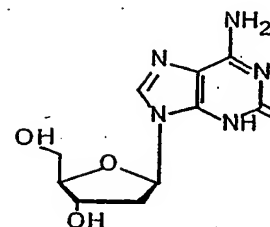
FIGURE 2



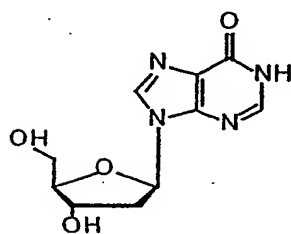
AZT



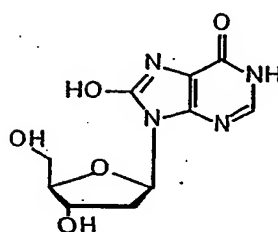
disoA



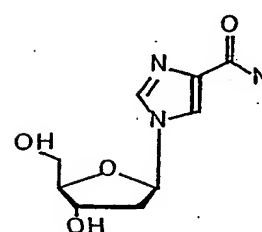
disoG



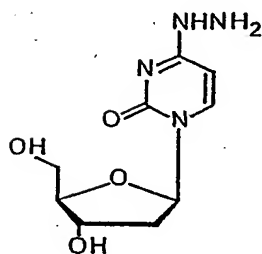
dl



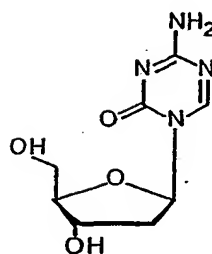
8ho'dl



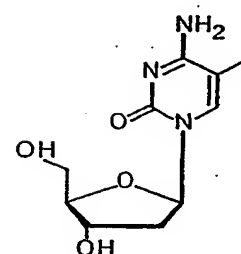
dY



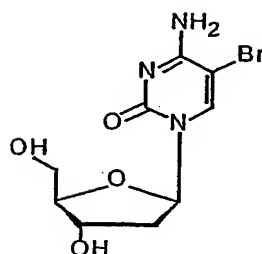
4am'dC



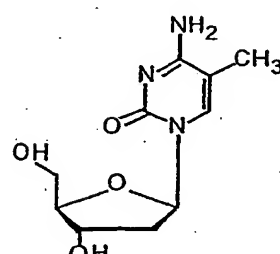
5azadC



5IdC



5BrdC



5MedC

FIGURE 3

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut Pasteur
Centre National de la Recherche Scientifique CNRS

<120> Mutants de la desoxycytidine kinase possédant une
activité enzymatique élargie

<130> D18773

<140> FR 01 04856

<141> 2001-04-10

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> DCK1 humaine D133E

<400> 1

Met Ala Thr Pro Pro Lys Arg Ser Cys Pro Ser Phe Ser Ala Ser Ser
1 5 10 15

Glu Gly Thr Arg Ile Lys Lys Ile Ser Ile Glu Gly Asn Ile Ala Ala
20 25 30

Gly Lys Ser Thr Phe Val Asn Ile Leu Lys Gln Leu Cys Glu Asp Trp
35 40 45

Glu Val Val Pro Glu Pro Val Ala Arg Trp Cys Asn Val Gln Ser Thr
50 55 60

Gln Asp Glu Phe Glu Glu Leu Thr Met Ser Gln Lys Asn Gly Gly Asn
65 70 75 80

Val Leu Gln Met Met Tyr Glu Lys Pro Glu Arg Trp Ser Phe Thr Phe
85 90 95

Gln Thr Tyr Ala Cys Leu Ser Arg Ile Arg Ala Gln Leu Ala Ser Leu
100 105 110

Asn Gly Lys Leu Lys Asp Ala Glu Lys Pro Val Leu Phe Phe Glu Arg
115 120 125

Ser Val Tyr Ser Glu Arg Tyr Ile Phe Ala Ser Asn Leu Tyr Glu Ser
130 135 140

Glu Cys Met Asn Glu Thr Glu Trp Thr Ile Tyr Gln Asp Trp His Asp
145 150 155 160

Trp Met Asn Asn Gln Phe Gly Gln Ser Leu Glu Leu Asp Gly Ile Ile
165 170 175

Tyr Leu Gln Ala Thr Pro Glu Thr Cys Leu His Arg Ile Tyr Leu Arg
180 185 190

Gly Arg Asn Glu Glu Gln Gly Ile Pro Leu Glu Tyr Leu Glu Lys Leu
 195 200 205

His Tyr Lys His Glu Ser Trp Leu Leu His Arg Thr Leu Lys Thr Asn
 210 215 220

Phe Asp Tyr Leu Gln Glu Val Pro Ile Leu Thr Leu Asp Val Asn Glu
 225 230 235 240

Asp Phe Lys Asp Lys Tyr Glu Ser Leu Val Glu Lys Val Lys Glu Phe
 245 250 255

Leu Ser Thr Leu
 260

<210> 2

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> DCK1 humaine R104Q

<400> 2

Met Ala Thr Pro Pro Lys Arg Ser Cys Pro Ser Phe Ser Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Thr Arg Ile Lys Lys Ile Ser Ile Glu Gly Asn Ile Ala Ala
 20 25 30

Gly Lys Ser Thr Phe Val Asn Ile Leu Lys Gln Leu Cys Glu Asp Trp
 35 40 45

Glu Val Val Pro Glu Pro Val Ala Arg Trp Cys Asn Val Gln Ser Thr
 50 55 60

Gln Asp Glu Phe Glu Glu Leu Thr Met Ser Gln Lys Asn Gly Gly Asn
 65 70 75 80

Val Leu Gln Met Met Tyr Glu Lys Pro Glu Arg Trp Ser Phe Thr Phe
 85 90 95

Gln Thr Tyr Ala Cys Leu Ser Gln Ile Arg Ala Gln Leu Ala Ser Leu
 100 105 110

Asn Gly Lys Leu Lys Asp Ala Glu Lys Pro Val Leu Phe Phe Glu Arg
 115 120 125

Ser Val Tyr Ser Asp Arg Tyr Ile Phe Ala Ser Asn Leu Tyr Glu Ser
 130 135 140

Glu Cys Met Asn Glu Thr Glu Trp Thr Ile Tyr Gln Asp Trp His Asp
 145 150 155 160

Trp Met Asn Asn Gln Phe Gly Gln Ser Leu Glu Leu Asp Gly Ile Ile
 165 170 175

Tyr Leu Gln Ala Thr Pro Glu Thr Cys Leu His Arg Ile Tyr Leu Arg

180 185 190
 Gly Arg Asn Glu Glu Gln Gly Ile Pro Leu Glu Tyr Leu Glu Lys Leu
 195 200 205
 His Tyr Lys His Glu Ser Trp Leu Leu His Arg Thr Leu Lys Thr Asn
 210 215 220
 Phe Asp Tyr Leu Gln Glu Val Pro Ile Leu Thr Leu Asp Val Asn Glu
 225 230 235 240
 Asp Phe Lys Asp Lys Tyr Glu Ser Leu Val Glu Lys Val Lys Glu Phe
 245 250 255
 Leu Ser Thr Leu
 260

 <210> 3
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> DCK1 humaine D133E-R104Q

 <400> 3
 Met Ala Thr Pro Pro Lys Arg Ser Cys Pro Ser Phe Ser Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Thr Arg Ile Lys Lys Ile Ser Ile Glu Gly Asn Ile Ala Ala
 20 25 30
 Gly Lys Ser Thr Phe Val Asn Ile Leu Lys Gln Leu Cys Glu Asp Trp
 35 40 45
 Glu Val Val Pro Glu Pro Val Ala Arg Trp Cys Asn Val Gln Ser Thr
 50 55 60
 Gln Asp Glu Phe Glu Glu Leu Thr Met Ser Gln Lys Asn Gly Gly Asn
 65 70 75 80
 Val Leu Gln Met Met Tyr Glu Lys Pro Glu Arg Trp Ser Phe Thr Phe
 85 90 95
 Gln Thr Tyr Ala Cys Leu Ser Gln Ile Arg Ala Gln Leu Ala Ser Leu
 100 105 110
 Asn Gly Lys Leu Lys Asp Ala Glu Lys Pro Val Leu Phe Phe Glu Arg
 115 120 125
 Ser Val Tyr Ser Glu Arg Tyr Ile Phe Ala Ser Asn Leu Tyr Glu Ser
 130 135 140
 Glu Cys Met Asn Glu Thr Glu Trp Thr Ile Tyr Gln Asp Trp His Asp
 145 150 155 160
 Trp Met Asn Asn Gln Phe Gly Gln Ser Leu Glu Leu Asp Gly Ile Ile
 165 170 175

Tyr Leu Gln Ala Thr Pro Glu Thr Cys Leu His Arg Ile Tyr Leu Arg
180 185 190

Gly Arg Asn Glu Glu Gln Gly Ile Pro Leu Glu Tyr Leu Glu Lys Leu
195 200 205

His Tyr Lys His Glu Ser Trp Leu Leu His Arg Thr Leu Lys Thr Asn
210 215 220

Phe Asp Tyr Leu Gln Glu Val Pro Ile Leu Thr Leu Asp Val Asn Glu
225 230 235 240

Asp Phe Lys Asp Lys Tyr Glu Ser Leu Val Glu Lys Val Lys Glu Phe
245 250 255

Leu Ser Thr Leu
260

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 octobre 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/083892 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N 15/10, 15/01, 15/54, 15/70,
9/12, 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:19)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/01252

(22) Date de dépôt international : 10 avril 2002 (10.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

01/04856 10 avril 2001 (10.04.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur
Roux, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR];
3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAR-
LIERE, Philippe [FR/FR]; 2, allée Saint Martin, F-91450
Etiolles (FR). POCHET, Sylvie [FR/FR]; 201, rue
Lecourbe, F-75015 Paris (FR). BOUZON, Madeleine
[FR/FR]; 4, rue des Capucins, F-92190 Meudon (FR).

(74) Mandataire : SANTARELLI; B.P. 237, 14, avenue de la
Grande Armée, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

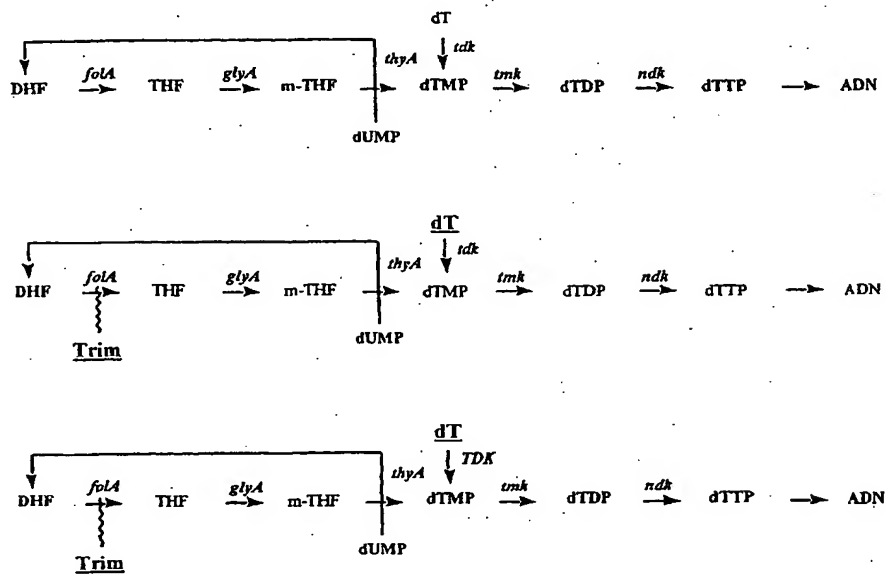
(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MUTANTS OF DESOXYCYTIDINE KINASE HAVING EXTENDED ENZYMATIC ACTIVITY

(54) Titre : MUTANTS DE LA DESOXYCYTIDINE KINASE POSSEDANT UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ELARGIE



(57) Abstract: The invention relates to a method for artificial *in vivo* evolution of proteins, said method making it possible to bring about the evolution of a protein X by complementation of a relative protein Y, X and Y both belonging to the same class of enzyme commission (EC) nomenclature or belonging to related classes. The mutants D133E and R104Q of desoxycytidine kinase (DCK) were obtained; both of said mutations result in acquisition of thymidine kinase activity by DCK.

[Suite sur la page suivante]

WO 02/083892 A3



eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

4 décembre 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé d'évolution artificielle *in vivo* de protéines, ledit procédé permettant de faire évoluer une protéine X par complémentation d'une protéine apparentée Y, X et Y appartenant tous deux à la même classe de la nomenclature enzymatique EC ou à des classes voisines. Les mutants D133E et R104Q de la désoxycytidine kinase (DCK) ont été obtenus, chacune de ces mutations conférant l'acquisition de l'activité thymidine kinase par DCK.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10 C12N15/01 C12N15/54 C12N15/70 C12N9/12
 C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WANG JIANGHAI ET AL: "An Escherichia coli system expressing human deoxyribonucleoside salvage enzymes for evaluation of potential antiproliferative nucleoside analogs." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 42, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 2620-2625, XP002193076 ISSN: 0066-4804 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-10, 13-30

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 April 2003

Date of mailing of the international search report

17/04/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOUZON M ET AL: "Human deoxycytidine kinase as a conditional mutator in Escherichia coli" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 320, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 427-434, XP004270078 ISSN: 0764-4469 cited in the application the whole document	1-10, 13-30
A	TOKUNAGA TETSUHIRO ET AL: "Efficacy of trimethoprim in murine experimental infection with a thymidine kinase-deficient mutant of Escherichia coli." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 41, no. 5, 1997; pages 1042-1045, XP002193077 ISSN: 0066-4804 the whole document	1-10, 13-30
A	WANG JIANGHAI ET AL: "Expression of human mitochondrial thymidine kinase in Escherichia coli: Correlation between the enzymatic activity of pyrimidine nucleoside analogues and their inhibitory effect on bacterial growth." BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 59, no. 12, 15 June 2000 (2000-06-15), pages 1583-1588, XP002193078 ISSN: 0006-2952 the whole document	1-10, 13-30
A	CHOTTINER E G ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN DEOXYCYTIDINE KINASE CDNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 88, February 1991 (1991-02), pages 1531-1535, XP000941361 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-10, 13-30

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OKAJIMA TOSHIHIDE ET AL: "Site-directed mutagenesis of AMP-binding residues in adenylate kinase: Alteration of substrate specificity."</p> <p>FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, vol. 334, no. 1, 1993, pages 86-88, XP002193079 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document</p>	1-10, 13-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/01252

Continuation of Box I.2

Claims : 11-12 – in full

19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 26 – in part

The current Claims 11 and 12 relate to a very large number of products (mutated protein X and/or mutated kinase X). In fact, they encompass so many alternatives, variables, possible permutations and conditions that they lack clarity (and/or conciseness) under the terms of PCT Article 6 to the extent that it is impossible to conduct a meaningful search covering the subject matter of the claims.

Therefore, the search was directed to the parts of the application that appear clear (and/or concise), i.e. a kinase as per Claim 13 comprising at least one mutation selected from the mutations D133E and R104Q. The search relating to Claims 19-22 and 24-27 covered the same kinase.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority, the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report or in the course of the procedure under PCT Chapter II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01252

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/10 C12N15/01 C12N15/54 C12N15/70 C12N9/12
C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12R

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, CAB Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WANG JIANGHAI ET AL: "An Escherichia coli system expressing human deoxyribonucleoside salvage enzymes for evaluation of potential antiproliferative nucleoside analogs." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 42, no. 10, octobre 1998 (1998-10), pages 2620-2625, XP002193076 ISSN: 0066-4804 le document en entier — —/—	1-10, 13-30

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 avril 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/04/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01252

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BOUZON M ET AL: "Human deoxycytidine kinase as a conditional mutator in Escherichia coli" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 320, no. 6, juin 1997 (1997-06), pages 427-434, XP004270078 ISSN: 0764-4469 cité dans la demande le document en entier	1-10, 13-30
A	TOKUNAGA TETSUHIRO ET AL: "Efficacy of trimethoprim in murine experimental infection with a thymidine kinase-deficient mutant of Escherichia coli." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 41, no. 5, 1997, pages 1042-1045, XP002193077 ISSN: 0066-4804 le document en entier	1-10, 13-30
A	WANG JIANGHAI ET AL: "Expression of human mitochondrial thymidine kinase in Escherichia coli: Correlation between the enzymatic activity of pyrimidine nucleoside analogues and their inhibitory effect on bacterial growth." BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 59, no. 12, 15 juin 2000 (2000-06-15), pages 1583-1588, XP002193078 ISSN: 0006-2952 le document en entier	1-10, 13-30
A	CHOTTINER E G ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN DEOXYCYTIDINE KINASE CDNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 88, février 1991 (1991-02), pages 1531-1535, XP000941361 ISSN: 0027-8424 le document en entier	1-10, 13-30

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01252

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>OKAJIMA TOSHIHIDE ET AL: "Site-directed mutagenesis of AMP-binding residues in adenylate kinase: Alteration of substrate specificity."</p> <p>FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, vol. 334, no. 1, 1993, pages 86-88, XP002193079 ISSN: 0014-5793 cité dans la demande le document en entier</p>	<p>1-10, 13-30</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 02/01252

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☒ Les revendications n°s (11,12)-complete (19,20,21,22,24,25,26,27)-partially
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour
qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210

3. ☐ Les revendications n°s
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la
troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s

4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: (11,12)-complete
(19,20,21,22,24,25,26,27)-partially

Les revendications 11 et 12 présentes ont trait à une très grande variété de produits (Proteine X mutée et/ou Kinase X mutée). En fait, les revendications contiennent tant d'options, de variables, de permutations possibles et de conditions que le manque de clarté (et/ou de concision) au sens de l'Article 6 PCT est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent claires (et/ou concises), c'est à dire une kinase selon la revendication 13 comportant au moins une mutation sélectionnée parmi les mutations D133E et R104Q. La recherche des revendications 19-22 et 24-27 a été effectuée pour la même kinase.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.